

## Síntesis, Caracterización y Estudio en Disolución del Ácido *N*-2-(4-amino-1,6-dihidro-1-metil-5-nitroso-6-oxopirimidinil)-L-Glutámico

María D. López-León, Paloma Arranz, María Dolores Gutiérrez

*Programa de Doctorado "Química de moléculas bioactivas: Diseño de fármacos (UJA/UGR)". Departamento de Química Inorgánica y Orgánica, Universidad de Jaén. Paraje Las Lagunillas s/n, 23071, Jaén, España.*

[parranz@ujaen.es](mailto:parranz@ujaen.es)

### Resumen

Se ha sintetizado el ácido *N*-2-(4-amino-1,6-dihidro-1-metil-5-nitroso-6-oxopirimidinil)-L-glutámico (AMNGLUH<sub>3</sub>) y caracterizado mediante técnicas de análisis elemental y térmico, espectroscópicas de ir, uv-visible y RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, y <sup>15</sup>N. Se ha estudiado el comportamiento ácido-base en disolución acuosa mediante técnicas potenciométricas y experimentos de RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C. El trianión AMNGLU<sup>3-</sup> experimenta cuatro procesos sucesivos de protonación que corresponden al átomo de nitrógeno y grupos carboxilato del resto aminoacídico y al grupo nitroso del anillo pirimidínico.

### INTRODUCCIÓN

Desde un punto de vista biológico, es de gran interés destacar la importancia de los aminoácidos *N*-sustituídos, debido a que con frecuencia son el resultado de las transformaciones que sufren los aminoácidos esenciales en las rutas biosintéticas (Voet D., *Bioquímica*, 1992, Ed. Omega, Barcelona, España).

En concreto, aquellos derivados cuyo sustituyente es el grupo *N*-2-(4-amino-1,6-dihidro-1-metil-5-nitroso-6-oxopirimidinil) son compuestos constituidos por un fragmento pirimidínico y otro aminoacídico, que se caracterizan por ser análogos a otros derivados aromáticos que contienen el grupo NO y que muestran actividad antiviral y antitumoral cuando se comportan como ligandos frente a determinados iones metálicos (Sigel, *Metals Ions in Biological Systems*, vol 9, 1979, New York, EEUU; Rice et al., *Nature* 1993, 361: 473; Huang et al., *J. Med. Chem.* 1998, 41: 1371).

Por otra parte, desde el punto de vista químico, es importante destacar que como ligandos son bases bifuncionales que pueden coordinar a los iones metálicos tanto por los grupos C(5)-NO y C(6)=O del fragmento pirimidínico (por lo general, en forma cooperativa) como por el fragmento aminoacídico, bien por el grupo carboxilato común en todos ellos, o bien por los grupos con átomos dadores presentes en la cadena lateral. Por otro lado, la rigidez del anillo pirimidínico impide que los dos fragmentos mencionados anteriormente puedan actuar de forma cooperativa y ésta es la razón por la cual, aunque en disolución forman complejos monoméricos a través de una u otra función (dependiendo del pH), en fase sólida actúan como ligandos puente, dando lugar, en general, a la formación de complejos polinucleares (Bonamartini, *Coord. Chem. Rev.* 1992, 117: 45; Arranz-Mascarós et al., *Polyhedron* 1999, 18: 793; Moreno et al., *Polyhedron* 1999, 18: 1635; López-

Garzón et al., *Inorganica Chimica Acta* 2003, 355: 41; Godino et al., *Acta Cryst.* 2004, B60: 46) cuyas estructuras cristalinas, en algunos casos, son similares a las de otros compuestos que presentan propiedades ópticas no lineales (Muthuraman et al., *Acta Cryst.* 2000, C56: 1077).

Es importante señalar que estos ligandos son fácilmente adsorbidos sobre carbón activado básico, dada la acidez arénica del anillo pirimidínico (Arranz-Mascarós, et al., *Transition Met. Chem.* 1998, 23: 501) que determina su retención sobre la superficie del carbón en base principalmente a interacciones  $\pi$ - $\pi$  arénicas del tipo donador (carbón) – aceptor (sistema pirimidínico) Por lo tanto, estas moléculas una vez adsorbidas sobre el carbón activado conservarían su reactividad con metales a través de la función aminoacídica, lo que hace a estos sistemas carbón activado/aminoácido *N*-sustituido potencialmente interesantes en la retención de metales y en la preparación de catalizadores (J. García-Martín et al., *Langmuir* 2005, en prensa; J. García-Martín et al., *Eur. J. Inorg. Chem.* 2005, en prensa).

En este trabajo se presenta la síntesis y caracterización del compuesto AMNGLUH<sub>3</sub>, con el objeto de, en nuestros próximos trabajos de investigación, poder utilizarlo adsorbido sobre un carbón activado como sistema eficaz en la retención de iones metálicos.

## EXPERIMENTAL

**Síntesis de AMNGLUH<sub>3</sub>.** Se disuelven 0.44 g (6.68 mmoles) de KOH en la mínima cantidad de agua. Se añaden 0.49 g (3.34 mmoles) de ácido L-glutámico y, una vez disuelto, se elimina el agua por evaporación. Una vez formada la sal potásica del aminoácido, se adicionan 0.62 g (3.34 mmoles) de 4-amino-1,6-dihidro-1-metil-2-metoxi-5-nitroso-6-oxopirimidina (Engelman, *Chem. Ber.*, 1909, 42: 177; Rodriguez Melgarejo C., Tesis Doctoral, 1979, Universidad de Granada, España) suspendidos en 40 ml de metanol. La mezcla se deja reaccionar con agitación y a temperatura ambiente durante 24 horas, se filtra a vacío y el filtrado se lleva a sequedad a presión reducida. El compuesto se disuelve en agua y se ajusta el pH de la disolución obtenida a un valor de 2.2. Finalmente, por evaporación lenta de la disolución, precipita el compuesto en forma de monocristales naranjas, aptos para la resolución de su estructura mediante difracción de rayos X. Rendimiento: 54 %. Anal. encontrado: C, 40.6; H, 5.1; N, 24.1 %. Anal. calculado para C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>: C, 40.1; H, 4.4; N, 23.4 %.

**Espectroscopía infrarroja.** Los espectros ir se registraron en un espectrofotómetro infrarrojo PERKIN-ELMER FT-IR modelo 1760X, preparando la muestra en forma de pastillas y utilizando KBr seco como dispersante.

**Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear.** Los espectros se han realizado utilizando un espectrofotómetro BRUKER modelo DPX300, a partir de disoluciones de las correspondientes muestras en DMSO-d<sub>6</sub>, y utilizando TMS como referencia para el caso de los espectros de <sup>1</sup>H- RMN, <sup>13</sup>C-RMN y bidimensionales <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC, y nitrometano como referencia externa (380.23 ppm respecto a NH<sub>3</sub> líquido) para los espectros bidimensionales <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HMBC. Para el estudio de los procesos de protonación se utilizó D<sub>2</sub>O como disolvente con DSS como referencia y NaOD y DCl para modificar el pH.

**Análisis elemental.** Para la determinación del contenido en C, N e H del ligando se

utilizó un equipo Fison´s modelo EA-1108.

*Análisis térmico.* Se utilizó un equipo formado por un calorímetro Shimadzu DSC-50 y una termobalanza Shimadzu TGA-50H. Los diagramas de TG y CDB se han registrado utilizando una atmósfera dinámica de aire puro con un flujo de  $100 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . En el primer caso, se ha empleado una velocidad de calentamiento de  $10 \text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , mientras que en el segundo la velocidad de calentamiento ha sido de  $20 \text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ .

*Espectroscopía ultravioleta/visible.* Los espectros electrónicos se han registrado utilizando un espectrofotómetro UV/VIS/NIR PERKIN-ELMER modelo lambda 19 a partir de disoluciones acuosas del ligando  $5\cdot 10^{-5}\text{M}$  (región ultravioleta) y  $10^{-3}\text{M}$  (región visible), utilizando KCl 0.1M como electrolito inerte.

*Potenciometría.* Las medidas potenciométricas de los sistemas ligando/protón se han llevado a cabo a  $25^{\circ}\text{C}$  y fuerza iónica 0.1M de KCl, utilizando un pH-metro Metrohm 713, equipado con un electrodo combinado y conectado a una autobureta Metrohm 765 Dosimat ( $1\text{mL}\pm 0.001$ ). El calibrado del electrodo se ha realizado aplicando el método de Gran (Gran *Analyst* 1952, 77: 661) y el valor del producto iónico del agua,  $K_w$ , se ha determinado mediante una titulación ácido-base según métodos bibliográficos (Liberti et al., *Journal of Chemical Education* 1962, 39: 236). Se han realizado valoraciones de disoluciones de concentración inicial aproximada de  $10^{-3}\text{M}$  utilizando KOH 0.1M como reactivo valorante, en el intervalo de pH de 2.3 a 11.3. Los experimentos de valoración son procesados por el programa HYPERQUAD (Gans et al., *Talanta* 1996, 43: 807), mediante el cual se obtienen las constantes de estabilidad de las especies formadas en disolución. Por último, los valores son introducidos en el programa HYSS (Gans P., HYSS, *Hyperquad Simulation and Speciation*, Protonic software 1998, England) para obtener el diagrama de distribución de especies del sistema en estudio.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

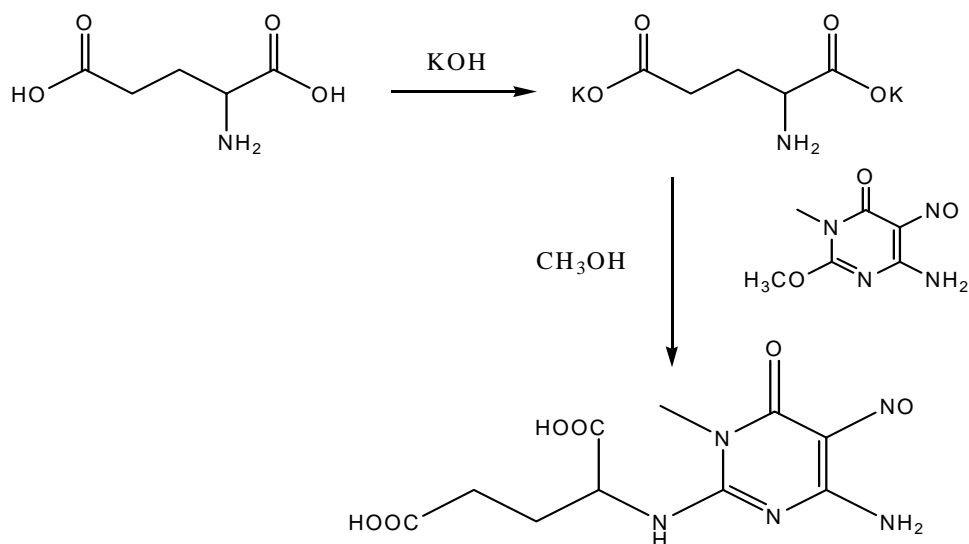
### *Síntesis de AMNGLUH<sub>3</sub>*

La síntesis de AMNGLUH<sub>3</sub> se ha llevado a cabo mediante un método general (Melguizo et al., *J. Heterocyclic Chem.* 2002, 39: 97) que consiste en la reacción del compuesto 4-amino-1,6-dihidro-1-metil-2-metoxi-5-nitroso-6-oxopirimidina, actuando éste como sustrato electrofílico, con un sustituyente nucleofílico básico. Debido al carácter electrón-atrayente de los grupos C(5)-NO y C(6)=O en la posición del anillo pirimidínico existe una deficiencia electrónica que facilita el ataque de reactivos nucleofílicos tipo amina, como es el caso del ácido glutámico en forma de sal potásica ( $^-\text{OOC}-\text{CHR}-\text{NH}_3^+$ ). De acuerdo con esto, la síntesis del ligando AMNGLUH<sub>3</sub> transcurre tal y como se indica en el esquema 1.

### *Caracterización estructural de AMNGLUH<sub>3</sub>*

*Análisis térmico.* Los diagramas de TG y CDB del AMNGLUH<sub>3</sub> ponen de manifiesto el carácter anhidro de la muestra. El compuesto es estable térmicamente hasta una temperatura de aproximadamente  $200^{\circ}\text{C}$ , iniciándose a dicha temperatura una rápida pérdida de peso (24%) responsable del efecto exotérmico que aparece en el diagrama de CDB centrado a  $232,69 \text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\Delta H = 74.81 \text{ KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). A partir de esta temperatura, la descomposición pirolítica transcurre más lentamente, finalizando alrededor de  $700^{\circ}\text{C}$ , temperatura a la que no queda ningún residuo en el crisol

portamuestras.



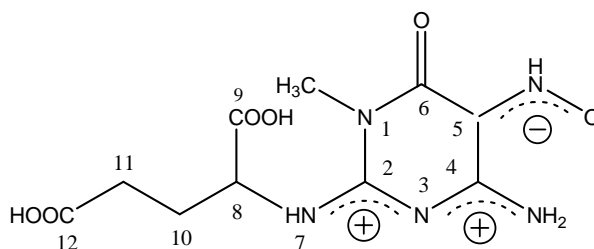
Esquema 1

*Espectroscopía infrarroja.* La asignación de las bandas del espectro infrarrojo de AMNGLUH<sub>3</sub> (Tabla 1) se ha realizado utilizando información existente en bibliografía para compuestos análogos (Arranz P., Tesis Doctoral, 1997, Universidad de Jaén, España).

Tabla 1. Datos de espectroscopia IR (cm<sup>-1</sup>) para el compuesto AMNGLUH<sub>3</sub>

u(OH) + u(NH)	u(C=O)pirim	u(C=O) <sub>γ</sub>	u(C=O) <sub>α</sub>	u(C=C) + u(C=N)	u(N=O)
3382/ 3289	1736	1692	1620	1576	1521

*Espectroscopía de resonancia magnética nuclear.* Para la caracterización estructural del compuesto AMNGLUH<sub>3</sub> se han registrado los espectros de RMN de <sup>13</sup>C y <sup>1</sup>H y los bidimensionales <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC y <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HMBC. El conjunto de los datos proporcionados por estos espectros ha permitido realizar las asignaciones de los átomos de H, C y N del compuesto AMNGLUH<sub>3</sub> que se recogen en las tablas 2-4. La numeración de los átomos es la que aparece en el esquema 2.



Esquema 2

Tabla 2. Datos de  $^1\text{H}$ -RMN para el compuesto  $\text{AMNGLUH}_3$

Señal	$\text{CH}_2(10)$	$\text{CH}_2(11)$	$\text{N}(1)\text{CH}_3$	$\text{CH}(8)$
$\delta(\text{ppm})$	2.12, 2H, m	2.39, 2H, m	3.35, 3H, s	4.65, 1H, m
Señal	$\text{NH}(7)$	$\text{C}(4)\text{NH}_2^*$	$\text{C}(4)\text{NH}_2^*$	$\text{COOH}(9), \text{COOH}(12)$
$\delta(\text{ppm})$	8.03, 1H, d, $J = 7.25 \text{ Hz}$	8.30, 1H, d, $J = 4.46 \text{ Hz}$	10.91, 1H, d, $J = 4.66 \text{ Hz}$	12.56, 2H, sa

d: doblete; m: multiplete; sa: señal ancha

\* Las señales de protón del grupo  $\text{NH}_2$  unido a C(4) aparecen desdobladas en dos dobletes a 8.30 y 10.91 ppm. Esto indica que uno de los hidrógenos puede estar formando un enlace de hidrógeno intramolecular con el oxígeno del grupo C(5)NO.

Tabla 3. Asignaciones de las señales de los átomos de C del compuesto  $\text{AMNGLUH}_3$

Señal	$\text{CH}_2(10)$	$\text{N}(1)\text{CH}_3$	$\text{CH}_2(11)$	$\text{CH}(8)$	C(5)
$\delta(\text{ppm})$	25.48	27.55	30.30	53.89	141.97
Señal	C(4)	C(2)	C(6)	$\text{COOH}(9)$	$\text{COOH}(12)$
$\delta(\text{ppm})$	149.30	154.75	161.40	172.40	173.85

Tabla 4. Asignaciones de las señales átomos de N del compuesto  $\text{AMNGLUH}_3$

Señal	C(4)-N	N(7)	N(1)	N(3)
$\delta(\text{ppm})$	94	103	136	170

Estos resultados están de acuerdo con la estructura del compuesto obtenida mediante difracción de rayos X (Arranz-Mascarós et al., *Acta Cryst.* 2003, C59: o210-o212). Como características estructurales más relevantes cabe destacar que el anillo heterocíclico es esencialmente plano, encontrándose los sustituyentes C(4) $\text{NH}_2$  y C(5)NO coplanares con el anillo, y que presenta una estructura electrónica polarizada tal como se muestra en el esquema 2. Ambos aspectos facilitarán la fijación de  $\text{AMNGLUH}_3$  sobre un carbón activado adecuado.

### **Estudio termodinámico y estructural de los procesos de protonación del ligando en fase disolución**

**Estudio potenciométrico.** Los resultados de este estudio se recogen en la tabla 5 y figura 1 y muestran que en disolución acuosa  $\text{AMNGLUH}_3$  se comporta como un ácido triprótico, que a valores bajos del pH se protona formando la especie catiónica  $\text{AMNGLUH}_4^+$ . La primera constante de protonación, significativamente más elevada que las siguientes, corresponde al proceso de protonación de un grupo con mayor carácter básico, como es el grupo amino que une el aminoácido con el anillo pirimidínico. La segunda y tercera constantes de protonación están en el intervalo de los valores encontrados para la protonación del grupo carboxilato. El valor de la cuarta constante, menor que el de las otras tres, está de acuerdo con la protonación del grupo C(5)NO, que tal y como revelan las características electrónicas de este compuesto (esquema 2) soporta una densidad de carga negativa.

**Estudio espectroscópico en la región ultravioleta-visible.** Con el fin de completar el estudio de los procesos de protonación del ligando, se han registrado los espectros electrónicos del mismo en la región uv-visible variando el pH desde 1.58 hasta 12.74. Las curvas espectrales obtenidas aparecen recogidas en la figura 2.



EQUILIBRIOS DE PROTONACIÓN	*log K
$\text{AMNGLU}^{3-} + \text{H}^+ = \text{AMNGLUH}^{2-}$	12.119 (8)
$\text{AMNGLUH}^{2-} + \text{H}^+ = \text{AMNGLUH}_2^-$	4.431 (1)
$\text{AMNGLUH}_2^- + \text{H}^+ = \text{AMNGLUH}_3$	3.000 (1)
$\text{AMNGLUH}_3 + \text{H}^+ = \text{AMNGLUH}_4^+$	1.9(2)

\*El valor entre paréntesis del log K es la desviación estándar correspondiente al último dígito.  $\sigma$  y  $\chi^2$  son parámetros de ajuste del programa HYPERQUAD.

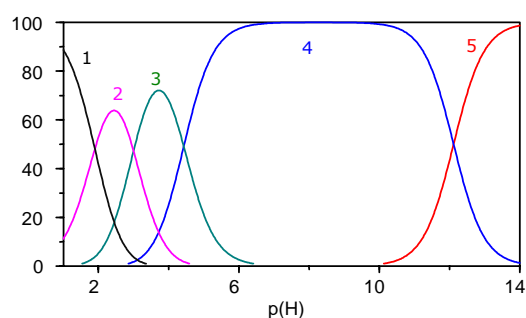


Figura 1. Diagrama de distribución del especies del sistema  $\text{AMNGLUH}_3/\text{H}^+$  (1=  $\text{AMNGLUH}_4^+$ ; 2= $\text{AMNGLUH}_3$ ; 3= $\text{AMNGLUH}_2^-$ ; 4= $\text{AMNGLUH}_2^-$ ; 5= $\text{AMNGLU}^{3-}$ )

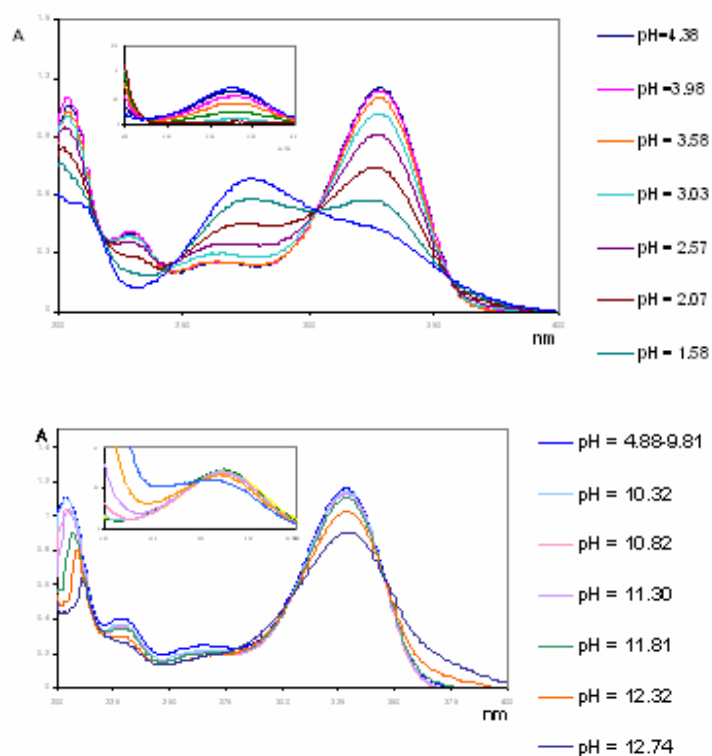


Figura 2. Espectros electrónicos de  $\text{AMNGLUH}_3$  en función del pH

Al bajar el pH desde 4.38 hasta 1.58, la banda que aparece a 326 nm, asignable a transiciones  $\pi \rightarrow \pi^*$  permitidas entre orbitales  $\pi$  del anillo pirimidínico, desaparece y aparece una banda a 275 nm. Por otra parte, también desaparece la banda a 525 nm asignable a una transición  $n_N \rightarrow \pi^*$  prohibida desde un orbital no enlazante del grupo NO a un orbital molecular antienlazante  $\pi^*$ . (López-Garzón et al., 2003, *Inorg. Chim. Acta*, 355: 41). Todo ello indica que la protonación tiene lugar sobre el grupo NO del anillo pirimidínico.

Por otra parte, a partir de pH = 10.32 la tendencia de las curvas anteriormente mencionada se invierte, es decir, a medida que aumenta el pH disminuye la absorción, probablemente debido al comienzo de la desprotonación del grupo NH(7).

Por último, aparece un punto isosbético en la zona del visible a aproximadamente pH = 12, lo que indica la existencia de dos especies en equilibrio en la disolución. Esto es coherente con el diagrama de distribución de especies, en el que se observa que coexisten las especies  $AMNGLUH^{2-}$  y  $AMNGLU^{3-}$  al valor del pH mencionado.

*Estudio espectroscópico de resonancia magnética nuclear.* En el espectro de  $^{13}C$ -RMN se observan ligeros cambios al comparar los espectros obtenidos a pH = 4.55 y a pH = 5.68 (Figura 3). Estos cambios consisten en la modificación en el desplazamiento químico de la señal correspondiente al carbono del grupo COOH(12) (1.3 ppm) y en la correspondiente al carbono del grupo  $CH_2$ (11) (0.98 ppm), lo que indica que al subir el pH por encima de 4.55 se produce la desprotonación del grupo COOH(12). Esto es coherente con el diagrama de distribución de especies en el que puede verse el predominio de la especie  $AMNGLUH^{2-}$  a partir de dicho valor de pH (4.55 aproximadamente).

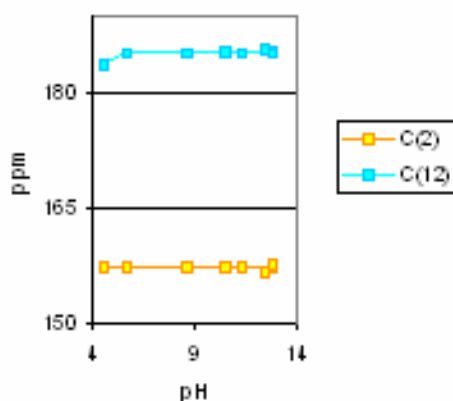


Figura 3. Representación del desplazamiento químico de las señales correspondientes a C(2) y C(12) en el espectro de  $^{13}C$ -RMN.

Por otra parte, entre pH = 11.76 -12.82 se observan cambios significativos en el desplazamiento químico de las señales correspondientes a los grupos  $CH_3$ ,  $CH_2$ (10),  $CH_2$ (11), CH y los COOH, probablemente originados por la desprotonación del NH(7). Este hecho se confirma en el espectro de  $^{13}C$ -RMN a pH = 12.82, en el cual las señales correspondientes a los grupos CH,  $CH_2$ (10),  $CH_2$ (11) y  $CH_3$  aparecen desdobladas (Figura 4). En dicho espectro aparece un grupo de señales

correspondientes a la especie  $\text{AMNGLUH}^{2-}$  y otro grupo de señales a mayor desplazamiento químico, lo que es indicativo de que la nueva especie  $\text{AMNGLU}^{3-}$  se hace mayoritaria a medida que aumenta el pH.

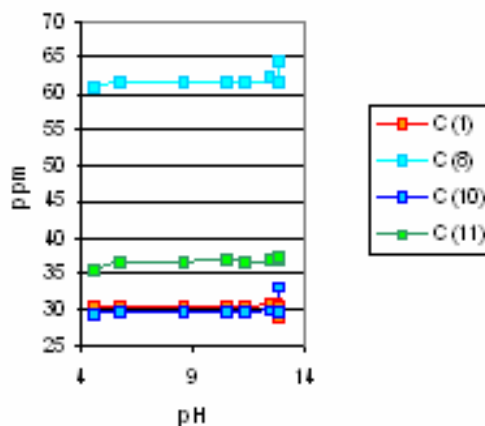


Figura 4. Representación del desplazamiento químico de las señales correspondientes a C(1), C(8), C(10) y C(11) en el espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN.

Por todo lo expuesto, podemos concluir que este trabajo aporta la síntesis y caracterización del compuesto *N*-2-(4-amino-1,6-dihidro-1-metil-5-nitroso-6-oxopirimidinil)-L-glutámico ( $\text{AMNGLUH}_3$ ), que presenta un fragmento aromático (una pirimidina), conectado a través de un separador alifático a un resto con dos grupos carboxílicos. El estudio del comportamiento ácido-base en disolución acuosa ha puesto de manifiesto que el compuesto se comporta como un ácido triprótico. La protonación de  $\text{AMNGLU}^{3-}$  ocurre sucesivamente en el átomo de nitrógeno y grupos carboxilato del resto aminoacídico. Además, se ha observado que a bajos valores de pH, tiene lugar la protonación del grupo nitroso del anillo pirimidínico. Las características estructurales y electrónicas de este compuesto muestran que se comporta como un compuesto de naturaleza bipolar lo cual puede favorecer su adsorción, mediante interacciones  $\pi$ - $\pi$ , sobre los centros arénicos básicos de un carbón activado, actuando éstos como donadores y los restos pirimidínicos de las moléculas  $\text{AMNGLUH}_3$  como aceptores, tal y como se ha observado para compuestos análogos (J. García-Martín et al., *Langmuir* 2005, en prensa). Es por tanto  $\text{AMNGLUH}_3$ , un compuesto que podrá ser utilizado en nuestras próximas investigaciones como receptor de iones metálicos, una vez adsorbido sobre un carbón activado adecuado.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación recibida por el Ministerio de Educación y Ciencia (CTQ2004-03332/PPQ) y por la Junta de Andalucía (FQM-273).